



## **Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 2: Residu golongan tetrasiklin dalam daging, telur, susu, dan olahannya**





© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	1
4 Bahan .....	2
5 Peralatan .....	2
6 Cara uji .....	2
7 Interpretasi hasil .....	5
Lampiran A (informatif) Ketentuan tambahan.....	6
Bibliografi .....	7



## Prakata

Standar Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 2: Residu golongan tetrasiklin dalam daging, telur, susu, dan olahannya disusun dan dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-03-S3 Metode pengujian peternakan. Standar ini disusun dengan maksud untuk standardisasi metode pengujian residu tetrasiklin dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif dan kuantitatif serta mendukung perundangan-undangan negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan..

Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode pengujian peternakan pada tanggal 14 Oktober 2008 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis dan pihak terkait lainnya.

Standar ini juga telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Februari 2009 sampai dengan 10 April 2009, dengan hasil akhir RASNI.



## **Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 2: Residu golongan tetrasiklin dalam daging, telur, susu, dan olahannya**

### **1 Ruang lingkup**

Standar ini menetapkan metode uji residu golongan tetrasiklin (oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, dan doksisisiklin) dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

### **2 Istilah dan definisi**

#### **2.1**

##### **daging**

bagian otot skeletal dari karkas ternak/hewan yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

#### **2.2**

##### **daging olahan**

daging yang telah mengalami proses pengolahan

#### **2.3**

##### **residu golongan tetrasiklin**

golongan tetrasiklin yang terkandung dalam daging, telur, dan susu, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan golongan tetrasiklin

#### **2.4**

##### **susu**

cairan yang berasal dari ambing ternak perah sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar sesuai ketentuan yang berlaku, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan

#### **2.5**

##### **susu olahan**

susu yang telah mengalami proses pengolahan

#### **2.6**

##### **telur**

telur yang dihasilkan oleh unggas yang belum mengalami proses pengolahan dan pengeraman untuk dikonsumsi manusia

#### **2.7**

##### **telur olahan**

telur yang telah mengalami proses pengolahan

### **3 Prinsip**

Residu golongan tetrasiklin dipisahkan dari matrik contoh, dimurnikan, kemudian diidentifikasi dan dikuantifikasi pada KCKT dengan kolom fase terbalik menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 365 nm.



## 4 Bahan

### 4.1 Standar pembanding

- a) oksitetrasiklin hidroklorida (OTC),
- b) tetrasiklin hidroklorida (TC),
- c) klortetrasiklin hidroklorida (CTC), dan
- d) doksisisiklin hidroklorida (DTC).

### 4.2 Bahan kimia dan penunjang

- a) asetonitril KCKT *grade*,
- b) metanol p.a,
- c) metanol KCKT *grade*,
- d) asam oksalat,
- e) asam sitrat monohidrat ,
- f) *ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt* (titriplex III Na<sub>2</sub>EDTA) ,
- g) *disodium hydrogen phosphate dihydrate* (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O),
- h) *trichloroacetic acid* (TCA),
- i) *aquabidest*,
- j) gas nitrogen,
- k) mini kolom (*cartridge*) C-18,
- l) filter *polytetrafluoroethylene* (PTFE) (0,45 µm, 47 mm),
- m) filter (0,45 µm, 13 mm).

## 5 Peralatan

- a) neraca analitik,
- b) gelas ukur (10 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml),
- c) labu *Erlenmeyer* (250 ml, 500 ml),
- d) labu ukur (10 ml, 100 ml),
- e) pipet volumetrik (1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml),
- f) mikro pipet (50 µl sampai dengan 200 µl, 100 µl sampai dengan 1000 µl),
- g) pH meter,
- h) *refrigerator*,
- i) corong,
- j) *homogenizer ultraturax* atau *food processor*,
- k) *vortex mixer*
- l) sentrifus,
- m) unit penyaring vakum,
- n) alat penguap (*vacuum rotary evaporator* atau *nitrogen evaporator*),
- o) labu *evaporator* (50 ml) atau tabung reaksi (10 ml)
- p) *ultrasonic bath*,
- q) satu unit KCKT dilengkapi dengan detektor UV-Vis,
- r) kolom KCKT fase terbalik C-18,
- s) tabung reaksi/tabung sentrifus bertutup 50 ml.

## 6 Cara uji

Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif (5 g atau 5 ml contoh yang ditambah larutan standar pembanding dengan konsentrasi 10 µg/ml sebanyak 75 µl, sehingga dihasilkan konsentrasi akhir 0,15 µg/g atau 0,15 µg/ml).



## 6.1 Pembuatan pereaksi/pelarut

### 6.1.1 Larutan dapar *McIlvaine* 0,01 M (pH 4,0)

Timbang *disodium hydrogen phosphate dihydrate* sebanyak 13,72 g, asam sitrat monohidrat sebanyak 11,8 g, *ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt* sebanyak 33,62 g, dilarutkan dengan *aquabidest* dalam labu ukur, atur pH larutan hingga 4,0 dengan asam sitrat monohidrat atau *disodium hydrogen phosphate dihydrate* dan tepatkan sampai 1000 ml

### 6.1.2 Larutan asam oksalat 0, 01 M

Timbang 1,26 g asam oksalat dan larutkan dalam 1000 ml *aquabidest*, kemudian disaring.

### 6.1.3 Campuran larutan asetonitril dengan metanol

Campur asetonitril KCKT *grade* dan metanol KCKT *grade* dengan perbandingan 3 : 5.

### 6.1.4 Larutan fase gerak

Campur larutan 6.1.2 dengan larutan 6.1.3 dengan perbandingan 7 : 3, kemudian saring dengan menggunakan filter PTFE, lakukan sonifikasi dengan menggunakan *ultrasonic bath* untuk menghilangkan gas dan udara (*degassing*).

### 6.1.5 Larutan TCA 20 %

Timbang 20 g TCA, kemudian larutkan dalam *aquabidest* dan tepatkan sampai 100 ml.

### 6.1.6 Larutan metanol 5 %

Ukur 5 ml metanol p.a kemudian tambahkan *aquabidest*, dan tepatkan sampai volume 100 ml.

### 6.1.7 Larutan standar campuran OTC, TC, CTC, dan DTC

#### 6.1.7.1 Larutan stok standar OTC, TC, CTC, dan DTC dengan konsentrasi 1000 µg/ml.

Timbang masing-masing 10 mg standar pembanding OTC, TC, CTC, dan DTC, kemudian masing-masing dilarutkan dengan metanol KCKT *grade* dalam labu ukur serta tepatkan masing-masing sampai 10 ml.

#### 6.1.7.2 Larutan standar kerja

Pipet sebanyak 100 µl untuk OTC dan TC, serta 200 µl untuk CTC dan DTC dari masing-masing larutan 6.1.7.1 ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian tambahkan larutan 6.1.4, dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/ml OTC dan TC, serta 20 µg/ml CTC dan DTC.

#### 6.1.7.3 Larutan untuk kurva standar

- a) Pipet 1 ml larutan 6.1.7.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 µg/ml untuk OTC dan TC, serta 2 µg/ml untuk CTC dan DTC.



- b) Pipet 500  $\mu$ l larutan 6.1.7.3.a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,05  $\mu$ g/ml untuk OTC dan TC, serta 0,1  $\mu$ g/ml untuk CTC dan DTC.
- c) Pipet 1 ml larutan 6.1.7.3.a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,1  $\mu$ g/ml untuk OTC dan TC, serta 0,2  $\mu$ g/ml untuk CTC dan DTC.
- d) Pipet 2 ml larutan 6.1.7.3.a ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,2  $\mu$ g/ml untuk OTC dan TC, serta 0,4  $\mu$ g/ml untuk CTC dan DTC.
- e) Pipet 400  $\mu$ l larutan 6.1.7.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4  $\mu$ g/ml untuk OTC dan TC, serta 0,8  $\mu$ g/ml untuk CTC dan DTC.
- f) Pipet 800  $\mu$ l larutan 6.1.7.2 ke dalam labu ukur, tambahkan larutan 6.1.4 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,8  $\mu$ g/ml untuk OTC dan TC, serta 1,6  $\mu$ g/ml untuk CTC dan DTC.

## 6.2 Prosedur ekstraksi contoh

- a) Timbang 5 g contoh padat/semi padat yang telah dihomogenkan dengan *homogenizer ultraturax* atau *food processor*, untuk contoh cair kocok dahulu kemudian pipet 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi/tabung sentrifus bertutup 50 ml.
- b) Tambahkan 2 ml larutan 6.1.5 dan kocok dengan *vortex mixer*.
- c) Tambahkan 15 ml larutan 6.1.1 dan kocok dengan *vortex mixer* selama 2 kali 30 detik.
- d) Sentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan.
- e) Tambahkan 10 ml larutan 6.1.1 ke dalam endapan 6.2.d, dan kocok dengan *vortex mixer* selama 2 kali 30 detik.
- f) Sentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan, dan gabungkan supernatan ini dengan supernatan 6.2.d, kemudian kocok dengan *vortex mixer*.

## 6.3 Pemurnian

### 6.3.1 Penyiapan/aktivasi mini kolom (Cartridge) C-18

- a) Alirkan 3 ml metanol p.a. ke dalam mini kolom C-18 secara perlahan-lahan.
- b) Alirkan 3 ml *aquabidest* ke dalam mini kolom C-18 secara perlahan-lahan, dan hindarkan terjadinya pembentukan gelembung udara di dalam mini kolom.

### 6.3.2 Proses pemurnian

- a) Alirkan ekstrak contoh 6.2.f ke dalam mini kolom C-18 yang sudah diaktivasi (6.3.1.b).
- b) Bilas mini kolom C-18 dengan mengalirkan 2 ml larutan 6.1.6 dan biarkan terbuang.
- c) Elusi mini kolom C-18 dengan mengalirkan 3 ml metanol p.a, tampung eluat dalam labu evaporator (50 ml) atau tabung reaksi (10 ml).
- d) Keringkan dengan alat penguap (*vacuum rotary evaporator*) atau nitrogen evaporator, hingga hampir kering.
- e) Larutkan kembali ekstrak 6.3.2.d hingga menjadi 200  $\mu$ l dengan larutan 6.1.4 kemudian saring dengan filter (0,45  $\mu$ m, 13 mm). Larutan siap diinjeksikan ke KCKT.



## 6.4 Penetapan dengan KCKT

### 6.4.1 Kondisi KCKT

- a) kolom : fase terbalik C-18,
- b) detektor : UV-Vis, panjang gelombang 365 nm.
- c) fase gerak : larutan 6.1.4
- d) kecepatan alir : 1 ml/menit

### 6.4.2 KCKT

- a) Injeksikan larutan 6.1.7.3 secara berurutan ke KCKT dengan kondisi 6.4.1 hingga diperoleh kurva linier ( $y = a + bx$ ).
- b) Injeksikan contoh 6.3.2.e.
- c) Lakukan pengamatan terhadap kurva pada kromatogram. Adanya kurva dengan waktu tambat yang sama dengan waktu tambat standar menunjukkan adanya residu golongan tetrasiklin pada contoh.
- d) Apabila area yang dihasilkan dari contoh 6.4.2.b melebihi area kurva kalibrasi 6.4.2.a, maka ekstrak 6.3.2.e dapat diencerkan sampai diperoleh area dalam rentang kurva kalibrasi.

## 7 Interpretasi hasil

Kadar residu golongan tetrasiklin dihitung menggunakan persamaan garis:

$$y = a + bx$$

**Keterangan :**

y = area contoh,  
a = *intercept*,  
b = *slope*.

$$\text{Kadar residu } \mu\text{g/g atau } \mu\text{g/ml} = \frac{X \times V_s}{B}$$

**Keterangan :**

X : Konsentrasi residu dalam contoh hasil integrasi kurva ( $\mu\text{g/g}$  atau  $\mu\text{g/ml}$ )  
Vs : Volume akhir sebelum injeksi (ml);  
B : Berat contoh (g) atau volume contoh (ml).



1. Setiap laboratorium yang akan menggunakan metode ini harus melakukan uji akurasi (ketepatan), presisi (ketelitian), limit deteksi (batas deteksi), dan limit kuantifikasi (batas penetapan).
2. Golongan tetrasiklin termasuk senyawa yang peka terhadap cahaya sehingga perlu dilindungi dari cahaya misalnya dengan menggunakan botol berwarna gelap atau aluminium foil.
3. Setiap akan melakukan pengujian gunakan selalu larutan standar kerja yang baru dibuat, sedangkan larutan stok standar dapat disimpan sampai dengan 1 bulan pada temperatur  $-18^{\circ}\text{C}$ .



## Bibliografi

Cinquina,A.L.; F. Longo,., G. Anastasi,; L. Giannetti,; R. Cozzani,.(2003) *Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline and Doxycycline in bovine milk and muscle*, Journal of Chromatography A, 987 227-233.

Furusawa N. 1999. *Rapid and simple determination of oxytetracycline in chicken products*. J. AOAC International Vol. 82 No 3: 770 - 772.

Hishao O.(1985). *Improvement of chemical analysis of antibiotics viii" application of prepacked c-18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver* J. of Chromatography, 325: 265-274.

Horwitz, W and G. W. Latimer (2005) *Drugs and Feed Additive in Animal Tissues in Official Methods of Analysis of AOAC International*, Edisi 18, chapter. 23.

Reimer G J. and L.M Young. (1990). *Validation of a method for determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle tissue*. J. AOAC Vol. 73 No. 5:613-817.























**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)